

**Beeinflussung einer in vitro-
Fettsäuresynthese durch verschiedene
Faktoren, nachgewiesen am ATP- und
Glukose-6- Phosphatgehalt des
verwandten Leberhomogenats während
der Synthese**

Jürgen Brandis

1962

**Beeinflussung einer in vitro-
Fettsäuresynthese durch verschiedene
Faktoren, nachgewiesen am ATP- und
Glukose -6- Phosphatgehalt des
verwandten Leberhomogenats während
der Synthese**

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin
verfaßt und
einer Hohen Medizinischen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von
Jürgen Brandis
aus Erfurt

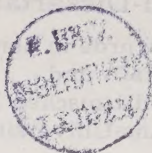
München 1962

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. W. SEITZ

Dekan: Prof. Dr. W. SEITZ

Tag der mündlichen Prüfung: 10. 7. 1962



HERRN u. FRAU BRENNER
IN DANKBARKEIT GEWIDMET



Digitized by the Internet Archive
in 2026

INHALTSVERZEICHNIS

A. INTERMEDIÄRER STOFFWECHSEL

Problemstellung

B. EXPERIMENTELLER TEIL

Versuchserklärung

Versuchsverläufe und Ergebnisse

C. DISKUSSION

A. INTERMEDIÄRER STOFFWECHSEL

Eine der grundlegenden Reaktionen des gesamten intermediären Stoffwechsels ist der Zitronensäurecyklus, in den Kohlenhydrat-, Eiweiss- und auch der Fettabbau führt. Dieser Zyklus, der 1937 von MARTIUS, KNOOP und KREBS aufgedeckt wurde, ist ein grosses Sammelbecken für Zwischenprodukte, die sowohl dem Aufbau von neuem, körpereigenem Material als auch dem zum Zwecke der Energiegewinnung nötigem Abbau dienen. Die beim Abbau der drei Grundnährstoffe zu Beginn des Zitronensäurecyklus stehende Substanz ist die "aktivierte Essigsäure".

Während die Glykolyse über die Brenztraubensäure und deren oxydativer Decarboxylierung zur Essigsäure führt, ist die zweite Möglichkeit die der Wood-Werkman Reaktion, nämlich der Weg über die Oxalessigsäure direkt in den Zitronensäurecyklus.

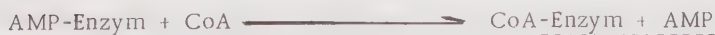
Der Fettabbau geht von der hydrolytischen Spaltung in Glycerin und Fettsäuren über die β -Oxydation und damit über die Entstehung von Acetyl-CoA ebenfalls in den Zyklus über.

Der Eiweissabbau dagegen ist wesentlich differenzierter. Einige Aminosäuren können aber desaminiert, β -oxydiert, zerlegt werden und sind damit in ihren Endabbauprodukten ebenfalls im genannten Zyklus zu finden.

Die "aktivierte Essigsäure" kondensiert in allen diesen Fällen mit der Oxalessigsäure, die am Zyklusbeginn steht und teils aus der Glykolyse stammt, teils zum Beispiel aus Asparaginsäure durch Transaminierung entstanden sein kann. Im Verlauf des Zyklus wird die entstandene C6-Verbindung (Zitronensäure) in einer Folge von Reaktionen abgebaut, nämlich 4fach dehydriert, 2fach decarboxyliert 2mal werden je ein Wassermolekül zugeführt. Nach diesem Vorgang tritt die für den gesamten Zyklus notwendige Oxalessigsäure wieder hervor, bei Anwesenheit von Acetyl-CoA wiederholt sich der Vorgang. Der während eines Zyklusdurchganges gewonnene Wasserstoff (4mal 2H) wird über die Atmungskette zu Wasser oxydiert. Aus diesem Prozess stammt der Hauptgewinn an Energie, der in Form von Adenosintriphosphat (ATP) gespeichert wird, indem Adenosindiphosphat (ADP) und anorganisches Phosphat zu ATP verestert werden. (1)

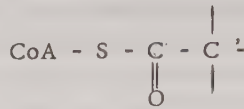
Die Entstehung des für den Zyklus und die Resynthese von körpereigenen Stoffen so notwendigen Acetyl-CoA haben LIPPMANN und JONES aufgeklärt. (2)

Der Aktivierungsvorgang vollzieht sich in drei aufeinanderfolgenden Schritten:



Intermediär bildet sich also zunächst eine energiereiche Adenylsäure-Enzym-

verbindung, die mit CoA in die ebenfalls energiereiche Enzym-CoA-Verbindung überführt wird und im nächsten Schritt mit Acetat = Acetyl-CoA ergibt (Energie-reiche Thioesterbindung).



Auch können durch CoA-Transphasasen CoA-Verbindungen höherer Fettsäuren entstehen. Dagegen wird bei Entstehung von Acetyl-CoA aus Pyruvat beziehungsweise Acetaldehyd keine Energiezufuhr benötigt, da die Dehydrierung einen exergonischen Prozess darstellt. (3)

Die "aktivierte Essigsäure" wird aber nicht nur weiter abgebaut, sie wird auch zur Synthese körpereigener Stoffe verwandt. Auch bei völligem Fehlen von Fett in der Nahrung wird überschüssig zugeführte Energie als Fett gespeichert, gleich, ob sie der Organismus in Form von Eiweiß oder Kohlenhydraten erhalten hat. Zu dieser Synthese körpereigenen Fettes werden die aktivierten Essigsäuremoleküle verwandt, die durch eine Art Umkehrung der β -Oxydation miteinander kondensiert werden. Dabei verläuft die Biosynthese der Fettsäuren nicht in exakter Umkehrung der Abbauvorgänge. (4) (9)

Aus einer Vielzahl von Acetyl-CoA Molekülen baut der Körper in "Totalsynthese" auch Cholesterin auf. (5)

Als Energielieferant für alle diese Vorgänge tritt immer wieder das ATP auf, es ist der wichtigste Energiespeicher und Energielieferant des intermediären Stoffwechsels. Das Adenosintriphosphat ist ein Nucleotid, aufgebaut aus einer Ribose, das OH in 5. Stellung mit H_3PO_4 verestert, und einer organischen Base, dem Adenin. Die geschilderte Verbindung ist das Adenosinmonophosphat (AMP). Eine weitere Phosphorylierung würde zum Adenosindiphosphat (ADP), eine 3fache Phosphorylierung zum Adenosintriphosphat (ATP) führen. Letzteres verfügt über zwei sehr energiereiche Bindungen. Da die Übertragung des PO_4^{---} auf Wasser exergonisch ist, besitzt ATP ein hohes Gruppenübertragungspotential für PO_4 -Gruppen. (6)

Die PO_4 -Gruppen können auf alkoholische Hydroxylgruppen, Säure- und Amidgruppen übertragen werden. Diese Reaktionen werden von sogenannten "Kinasen" katalysiert. So katalysiert das Ferment "Hexokinase" die Phosphorylierung der Glukose zu Glukose-6-phosphat.

Problemstellung

Wie schon erwähnt, benutzt der Organismus die ständig entstehende "aktivierte Essigsäure" auch zum Aufbau körpereigener Substanzen, zum Beispiel der Fette. Der erste Schritt dazu ist die Synthese der Fettsäuren.

Unter Verwendung eines an anderer Stelle genauer beschriebenen Leberhomo-

genats, das die fettsäuresynthetisierenden Fermente enthält, sowie C₁₄-markierten Acetats als Ausgangssubstrat und verschiedenen anderen Zusätzen haben wir eine in vitro Fettsäuresynthese unter weitgehend physiologischen Bedingungen nach BRADY und GURIN durchgeführt. (11)

Wichtig war für uns, die schon durch zahlreiche Versuche gewonnene Erkenntnis der Beeinflussung von Fettsäuresynthesen durch bestimmte Zusätze jetzt auch von der energetischen Seite her zu untersuchen.

B. EXPERIMENTELLER TEIL

Versuchserklärung (Methodik)

Als die Synthese beeinflussende Substanzen wurde die Wirkung folgender organischer Säuren untersucht:

Propionsäure	(C3)	Buttersäure	(C4)
Valerian-	(C5)	Capron-	(C6)
Capryl-	(C8)	Caprin-	(C10)
Undecyl-	(C11)	Tridecyl-	(C13)
Pentadecyl-	(C15)	Palmitin-	(C16)

Daneben haben wir den Einfluss von Mn⁺⁺, CO₂ durch eine der Inkubation vor- ausgehende CO₂-begasung, und den Einfluss von frisch aus Taubenleber bereitetem, die Fettsäuresynthese fördernden "Faktor" wie auch eines "Trockenfaktor" untersucht. (8)

Die Säuren wurden zu jeweils 10 mg. beigegeben, das MnCl₂ zu 0,05 mg., der "Trockenfaktor" zu 10 mg.

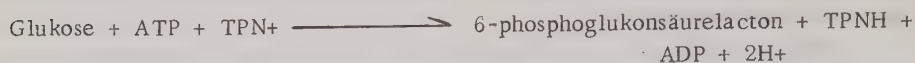
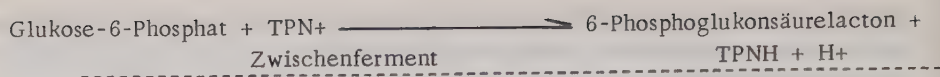
Die Aufgabe dieser Arbeit soll es sein, den ATP- und Glukose-6-phosphatgehalt im Verlauf der Fettsäuresynthese zu verfolgen. Für jeden Versuch wird der ATP-gehalt des zur Fettsäuresynthese verwandten löslichen Enzymsystems vor und während der Synthese bestimmt. Gleichzeitig wird die jeweilige Ausbeute an synthetisierten radiomarkierten Fettsäuren bestimmt.

Die Ergebnisse sind teils in Tabellen, teils in graphischen Darstellungen gezeigt.

Das ATP und das Glukose-6-Phosphat wird mit Hilfe eines enzymatischen Testes nach O. WARBURG, modifiziert nach W. LAMPRECHT, bestimmt.

Glukose wird in Anwesenheit von Mg⁺⁺ durch ATP zu Glukose-6-Phosphat phosphoryliert, diese Reaktion katalysiert das Enzym Hexokinase. Das von O. WARBURG entdeckte Zwischenferment (Glukose-6-phosphatdehydrogenase) katalysiert im nächsten Schritt die Dehydrierung des Glukose-6-Phosphats zu 6-Phosphoglukon- säurelacton durch TPN⁺ (Triphosphopyridinnucleotid).





1 Mol entstandenen TPNH entspricht 1 Mol verbrauchten ATP, die Hexokinase setzt bei genügendem Glukose-, Coenzym- und Mg^{++} -Angebot das ATP quantitativ um. Der freiwerdende Wasserstoff wird durch den dem Homogenat zugesetzten Puffer abgefangen, um für die Synthese optimale pH-Verhältnisse zu bekommen.

Folgende Chemikalien wurden verwandt; (7)

Triäthanolamin-Puffer (0,05 M, pH 7,5-7,6)

4,65 g. Triäthanolaminhydrochlorid in ca. 200 ml. Wasser lösen, 2 ml. 1 Mol. Natronlauge p.a. hinzufügen, nach Temperieren ad 500 ml.

Triphosphopyridinnucleotid Na-Salz etwa 90 %

($7,10^{-3}$ M. TPN⁺) 7,5 mg. TPN-NaH (ca. 6 % Wasser) ad 1,5 ml. Wir verwandten das entsprechende Präparat der Fa.Boehringer.

Magnesiumchlorid MgCl_2 (0,1 M) 476 mg. ad 50 ml.

Glukose (0,5 M) 9,91 g. Glukose ($\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6 \cdot \text{H}_2\text{O}$) p.a. ad 100 ml.

Glukose-6-Phosphatdehydrogenase (ZF)

a) je nach spezifischer Aktivität 10-15 mg. lyophilisiertes Enzym ad 1,0 ml.

b) (200 mg. Enzym/ml.) 0,3 ml. der Enzymkristallsuspension (1 mg./ml. in 3,3 M Ammoniumsulfat-Lösung) ad 1,5 ml. Fa.Boehringer

Hexokinase (HK) ca. 10-15 mg./ml. Abhängig von der spezifischen Aktivität 10-30 mg. lyophilisiertes Enzym in 2,0 ml. lösen. Fa.Sigma, USA

Crude Type 3

Perchlorsäure (HClO_4) ca. 6 % W/V

a) 7,5 ml. HClO_4 p.a. Dichte 1,64 ad 150 ml.

b) 9,1 ml. HClO_4 p.a. Dichte 1,53 ad 150 ml.

Kaliumcarbonat (ca. 5 M. K_2CO_3) ca. 72 g. K_2CO_3 p.a. ad 100 ml.

Methylorange (Indikator) ca. 50 mg. in 100 ml.

Die Glukoselösungen wurden wöchentlich erneuert, der Puffer je nach Bedarf, alle anderen Lösungen haben wir für jeden Test neu angesetzt.

Das für den Versuch notwendige Ferment'system wird auf folgende Weise gewonnen:

Einige Tage gut gefütterte Tauben werden decapitiert, die Lebern werden entnommen, in eisgekühlte Schalen gelegt und vom groben Bindegewebe befreit. Auffällig veränderte Lebern, etwa Metastasen-, Echinococcus-, Ikteruslebern oder solche, die starke Fettinfiltrationen zeigten, werden ausgeschieden. Nach grober Zerkleinerung werden die Organe gewogen und mit einer Menge Puffer⁺ versetzt,

⁺ 0,085 m K_2HPO_4 0,009 m $\text{K H}_2\text{PO}_4$ 0,07 m KHCO_3 zu gleichen Teilen. pH 7,4

die durch Multiplikation des Lebergewichtes mit 1,2 gefunden wird. Danach erfolgt Homogenisation. Das Homogenat wird 45 min. bei 3000 U/min. in der Kälzentrifuge zentrifugiert, der Überstand mit Puffer aufgefüllt und erneut zentrifugiert, diesmal 75 min. bei 32000 U/min.

Der entnommene Überstand = SUP wird zur Fettsäuresynthese verwendet. Er enthält alle Fermentsysteme der Leber, insbesondere die fettsäuresynthetisierenden Fermente, auch Glukose-6-phosphat und eventuell etwas Glukose sowie ATP. Der Rückstand wird in der nachfolgenden Weise zum "Faktor" verarbeitet.

Seine Herstellung geschah nach der von v. BRAND beschriebenen Methode. (8)

Der nach dem zweiten Zentrifugieren (32000 U/min.) bleibende Rückstand wird in mehreren Portionen in einem Gläschen etwa 25 min. im Wasserbad erhitzt. Der verbleibende trockene Rest wird in Puffer gelöst (Phosphat-Bicarbonat-puffer) und dann als "Faktor" dem fettsäuresynthetisierenden Fermentsystem in einer Menge von 10 mg. zugesetzt.

Dieser Faktor wird abgedampft und als "Acetontrockenpulver" mit 10 mg. den jeweiligen Versuchsansätzen zugegeben.

Der Versuch

Nachdem 2,4 ml. SUP mit 0,1 ml. $MgCl_2$ (0,006 m Endkonzentration), 0,1 ml. Na-citrat (0,01 m) und 0,4 ml. C_{14} -Acetat (2 mg. Acetat 11000 Imp./min. 0,008 m Endkonzentration) versetzt worden sind, wird die Lösung bei 38° in den Warburg-Apparat inkubiert. Nach 20 min., 40 min., 80 min. und 180 min. werden Versuchsansätze entnommen und in nachfolgend beschriebener Weise auf ATP und Glukose-6-Phosphat geprüft.

Eine genügende Menge der Versuchsansätze wird mit KOH am Rückflusskühler (4 Stunden) verseift und nach Ansäuern werden die freien synthetisierten und markierten Fettsäuren im Schütteltrichter mit Petroläther ausgeschüttelt, auf 10 ml. aufgefüllt und 1 ml. des Petrolätherauszuges auf ein mit einem Lenspapier versehenes Aluminiumplättchen mit Rand ($\varnothing$ 2,5 cm) aufgetropft. Der Petroläther wird verdampft und die Radioaktivität mit dem Geigerzähler nach der direkten Methode von ENTENMAN und DAUBEN gemessen. Das Ergebnis wird auf einen Eichwert einer C_{14} -Standartfolie umgerechnet und in Impulsen pro Minute angegeben.

Von den auf ATP und Glukose-6-Phosphat zu untersuchenden Versuchsansätzen werden je 1 ml. entnommen und mit einer gleichen Menge eisgekühlter Perchlorsäure ($HClO_4$) vermischt und enteieisst. Anschliessend erfolgt ein 10 min. andauerndes Zentrifugieren bei 32000 U/min., damit wird das Absetzen der denaturierten ausgefällten Eiweissfraktion erreicht. Hiermit ist also jeder weitere enzymatische Vorgang im SUP gestoppt.

Der vom Rückstand getrennte SUP wird in einer Menge von 1 ml. mit 0,1 ml. Methylorange (Indikator) vermischt und gegen KCO_3 mittels einer 0,2 ml.

Kapillar-Pipette unter ständigem Umrühren neutralisiert. Bei sämtlichen Manipulationen wurde der SUP in einem Eisbecher gekühlt. Die neutralisierte Lösung wird im Kühlschrank abgestellt, nach etwa 10 min. durch Abgiessen vom Niederschlag (KClO_4) getrennt und zum eigentlichen Test verwandt.

Die Lösungen werden in der angegebenen Reihenfolge in die Küvette (Strahlendurchgang 2 cm) pipettiert.

SUP	0,20 ml.	Beispiel	
Puffer	3,90	E_1	0
TPN+	0,06		7 ----- ZF
MgCl_2	0,35		15
Z^F	0,02		17
	-----	E_2	19 ----- ZF
ZF	0,02		21
	-----	E_3	21
Glukose	0,4		21 ----- Glukose
	-----	E_4	20 ----- HK
HK	0,05		50
	-----	E_5	62
HK	0,05		70
		E_6	79 ----- HK

Berechnung

$$(E_2 - E_1) - (E_3 - E_2) = \Delta E \text{ Glukose-6-Phosphat}$$

$$(E_5 - E_4) - (E_6 - E_5) = \Delta E \text{ ATP}$$

Der ATP- und Glukose-6-Phosphatgehalt lässt sich daraus wie folgt berechnen:

$$V_K \quad / = \text{Endvolumen in der Küvette nach der letzten Enzymgabe.}$$

$$V_1 = \text{Gewicht}$$

$$V_2 = V_1 + 1 \text{ ml. Perchlorsäure}$$

$$V_3 = \text{Volumen Perchlorsäure minus Extrakt vor der Neutralisation}$$

$$V_4 = V_3 \text{ ml. } \text{KCO}_3\text{-Verbrauch}$$

$$V_5 = \text{Volumen der enteweissten Lösung in der Küvette}$$

so ist:

$$\epsilon \frac{E \cdot V \cdot V \cdot V}{d \cdot V \cdot V \cdot V} = \frac{\gamma \text{ ATP}}{\text{g. Organ}}$$

ϵ = Extinktionskoeffizient von TPNH im dekadischen log., für die Messstrahl-

lung 366 mn wird $\epsilon = 3,3$ in die Gleichung eingesetzt.

Ergebnisse

- a) In umstehenden Tabellen zeigt die erste, horizontale Spalte die gefundenen Werte für den Normal-SUP (ohne Zusatz), die zweite Spalte zeigt die Werte von SUP + Zusatz 1, die dritte Spalte die Werte von SUP + Zusatz 2, wobei die Indices der angeführten C auf die Kettenlänge der zugesetzten Säuren hinweisen. TF bedeutet Trockenfaktor. Die Inkubationszeiten sind am äusseren Rand der Tabellen aufgeführt. (0 min., 20 min., 40 min., 80 min., 180 min.) Die jeweiligen Werte sind in drei zusammengehörigen Zahlenkomplexen, aus sechs Zahlenkombinationen bestehend, gezeigt. Die beiden oberen Zahlen geben den ATP-Gehalt des betreffenden Versuches wieder. Die erste Zahl zeigt den ersten, die zweite den zweiten Versuch.

Die mittleren Zahlen sind die zu den ATP-Werten gehörigen Glukose-6-Phosphatwerte.

Die unteren Reihe zeigt die gemessenen Impulse.

In einigen Fällen wurde neben dem Normal-SUP nur ein SUP + Zusatz getestet, hier haben wir in kürzeren Zeitabständen gemessen.

- b) Die Beeinflussung der Fettsäuresynthese eines in der dargelegten Weise präparierten Fermentsystems durch Fettsäuren ist von verschiedenen Autoren beschrieben worden. (10)

Die Versuchsverläufe von Propionsäure, Butter-, Valerian- und Capronsäure zeigten keine Beeinflussung der Fettsäuresynthese. Dasselbe gilt für die ATP-Verhältnisse. Das heisst, der ATP-Abfall verlief bei dem Normal-SUP sehr ähnlich dem beim Zusatz-SUP. Auch die Glukose-6-Phosphatverhältnisse liessen keine Beeinflussung durch den Zusatz erkennen. Geringe Schwankungen der Ausgangswerte des ATP und der Glukose-6-Phosphatwerte bei Normal-SUP und Zusatz-SUP sind wohl ausschliesslich auf Schwankungen zurückzuführen, unter denen jeder biologische Test zu leiden hat.

Bei 3 Testen mit Caprylsäurezusatz zeigte sich eine wesentlich verminderte Fettsäuresynthese, während der ATP-Gehalt im Verhältnis zum Normal-SUP beschleunigt abfiel. Der Gehalt an Glukose-6-Phosphat der Versuchslösung hat in 3 Versuchen 3 verschiedene Verläufe gezeigt.

Beim Zusatz von Caprinsäure wurde die Synthese wesentlich gehemmt, der ATP-Gehalt erreichte jeweils bei 80 min. den Nullwert. Die Glukose-6-Phosphatkurve verlief bei Normal-SUP und Zusatz-SUP gleich. Der ATP-Abfall erschien unbeeinflusst.

Auch der Zusatz von Undecylsäure ergab eine starke Synthesehemmung bei sehr schnellem ATP-Abfall (bei 80 min. = 0-Wert). Wieder schien der ATP-Abfall vom Zusatz nicht beeinflusst. Auch der jeweilige Gehalt an Glukose-6-Phos-

phat erschien unbeeinflusst.

Der Tridecylsäurezusatz führte zu einer starken Synthesehemmung bei beschleunigtem ATP-Abfall. Die Glukose-6-phosphatwerte glichen denen des Normal-SUP.

Die Pentadecylsäure führte zu einer Synthesehemmung bei etwas beschleunigtem ATP-Abfall. Die Glukose-6-Phosphatkurve ergab keine Änderungen.

Der Zusatz von Palmitinsäure ergab völlig verschiedene Ergebnisse. Die Fettsäuresynthese wurde sowohl wesentlich gesteigert, wobei der ATP-Gehalt trotzdem in der Kurve dem des Normal-SUP glich, als auch nicht wesentlich beeinflusst, wobei der ATP-Abfall im Verhältnis zum Normal-SUP etwas beschleunigt war. Der Verlauf des Glukose-6-Phosphatgehaltes zeigte in allen Versuchen keine Abweichungen von der des Normal-SUP.

Der $MnCl_2$ -Zusatz ergab wie erwartet eine Synthesesteigerung, die sich auch im rascheren ATP-Abfall zeigte. Die Glukose-6-Phosphatwerte nahmen bei jedem Versuch einen unterschiedlichen Verlauf, eine Gesetzmässigkeit konnten wir nicht finden.

Die Werte der CO_2 -Begasung zeigten eine Synthesesteigerung, die unter der des $MnCl_2$ -Zusatzes lag. Die ATP-Kurve fiel ebenso wie die des Glukose-6-Phosphat beschleunigt ab und erreichte eher den Nullwert.

Bei den Versuchen mit "Trockenfaktor" ergaben sich folgende Ergebnisse: Die Synthese zeigte sowohl wesentliche Steigerungen als auch nur geringe. Zumindest konnten wir keine Hemmung feststellen. Die Synthesewerte des SUP mit "Trockenfaktor" Zusatz lagen immer über denen des Normal-SUP. Das Adenosintriphosphat fiel bei 5 Versuchen bis 20 min. Inkubationszeit gemeinsam mit dem des Normal-SUP, um auf ein Maximum bei 40 min. zu steigen. In 1 von 7 Fällen lag dieses Maximum über dem ATP-Ausgangswert. Bei 1 Versuch fiel das ATP bis 20 min., um bei 80 min. ein Maximum zu erreichen. Von diesem Höchstwert war ein stetes Fallen bis zum Erreichen des 0-Wertes zu beobachten.

Die Glukose-6-Phosphatverläufe:

- 1 + 2) Wir stellten einen mit der Normal-SUPkurve gemeinsamen Abfall vom Ausgangswert bis 20 min. Inkubationszeit fest. Bei 40 min. schnellten die Werte auf ein Maximum, von da allmählicher Abfall.
- 3 + 4 + 5) gemeinsam mit der Normal-SUPkurve ein Abfall bis 20 min. Inkubationszeit, dann von hieraus Ansteigen um bei 80 min. ein Maximum zu erreichen. Von diesem Punkt an allmählicher Abfall.
- 6 + 7) Ansteigen vom Ausgangswert an bis zu einem Maximum bei 40 min., von hier ab allmählicher Abfall.

Sämtliche Maxima der Glukose-6-Phosphatverläufe lagen über den Ausgangswerten. Einen Zusammenhang zwischen ATP-Maxima und denen des Glukose-6-Phosphats konnten wir nicht feststellen.

Die Versuche, bei denen "Faktor" eingesetzt wurde, ähneln im Ergebnis im wesentlichen denen des "Trockenfaktors". Die Fettsäuresynthese erfuhr eine wesentliche Steigerung. Die ATP-Werte fielen bei 2 Versuchen bis 40 min. Inkubations-

zeit ab um bei 80 min. ein Maximum zu erreichen. Die Maxima erreichten nie die Ausgangswerte. Die Kurve des Glukose-6-Phosphat fiel bis 20 min. und erreichte bei 80 min. ein Maximum, das in beiden Fällen über dem Ausgangswert lag. Bei 2 weiteren Versuchen fielen die ATP-Werte ab bis 20 min. um bei 40 min. ein Maximum zu erreichen. Die Glukose-6-Phosphatwerte fielen bei einem der beiden Versuche bis 20 min. und erreichten bei 40 min. ein Maximum, das über dem Ausgangswert lag. Der zweite Versuch zeigte eine stetig abfallende Glukose-6-Phosphatkurve vom Ausgangspunkt an.

	SUP	Faktor	T.Faktor	SUP	Faktor
0'	100-231	104-231	139-236	318	354
	94- 86	104-107	58-105	39	61
	- - -	- - -	- - -	- - -	- - -
20'	25-126	82-156	104-170	163	202
	36- 68	34- 84	96- 58	21	25
	1782-2750	1621	1701	3315	2784
40'	39- 83	74-139	78-179	178	179
	62- 48	316-323	336-324	52	104
	3950-3540	3000-3110	2540-3665	4340	4735
80'	4- 4	34- 17	34- 17	76	238
	4- 2	66- 18	86- 28	7	236
	4150-5105	3640-3460	4300-3800	5650	7336
180'	0- 0	13- 0	8- 0	0	4
	0- 0	8- 8	12- 18	2	2
	4250-4090	3705-3360	4445-4350	6430	8245

	SUP	TF	MnCl ₂	SUP	C16
	220-166	265-166	313-183	203-210	163-227
0'	12- 22	36- 25	31- 24	38- 22	83- 24
	- -	- -	- -	- -	- -
	13- 17	184- 61	0- 8	105-148	106-138
20'	4- 6	12- 6	4- 6	12- 16	6- 4
	2210-1150	1555-886	1600-712	1625-2545	1250- 49
	4- 4	163- 87	10- 39	101-149	78-119
40'	2- 4	96- 56	4- 8	9- 12	9- 8
	2465-1702	3186-3040	1878-2282	2265- 89	1592-4700
	8- 13	26- 56	0- 0	50- 21	4- 8
80'	0- 14	6-149	0- 2	2- 0	2- 20
	3250-3680	4620-2620	2624-4540	2380- 49	2320-2245
	4- 13	4- 8	0- 0	0- 8	13- 0
180'	2- 6	4- 30	2- 4	0- 2	2- 4
	3720-3900	4390-3920	2900-4760	3040-1635	3115-3890

	SUP	C10	C11	SUP	C5
	209-275	200-292	218-274	258-221	263-215
0'	30- 87	30- 62	28- 54	40-134	34-105
	- -	- -	- -	- -	- -
	157-130	118- 47	162-126	144-133	157-121
20'	32- 26	60- 22	48- 28	58- 34	48- 37
	1885-1880	160-100	416-291	2280-398	1236-328
	166-148	57- 25	48- 26	118- 96	135-127
40'	36- 40	36- 32	4- 0	36- 10	52- 30
	3000-2260	152- 60	862-213	3050-578	2045-726
	73- 78	0- 0	0- 0	39- 79	43-127
80'	10- 6	0- 0	0- 0	6- 8	0- 6
	4450-3490	197-104	445-338	3190-859	3280-915
	0- 0	0- 0	0- 0	13- 0	0- 17
180'	2- 0	0- 0	0- 0	0- 0	2- 6
	5180-3660	472-140	1399-387	3230-1480	3170-498

	SUP	C3	C6	SUP	C4
0'	263-235	275-240	248-222	171-258	127-275
	70- 26	70- 30	76- 40	110- 40	56- 38
	- - -	- - -	- - -	- - -	- - -
20'	30-113	83-148	43- 70	43-144	96-156
	6- 20	20- 18	6- 14	16- 58	18- 43
	1910-1925	2090-1563	1632-539	2435-2280	2310-1412
40'	30- 74	74- 74	26- 43	52-118	57-135
	8- 0	8- 0	4- 4	4- 36	6- 60
	2470-2510	2471-2640	2370-1080	3063-3050	2942-2200
80'	4- 26	4- 17	0- 30	16- 39	22- 52
	0- 0	0- 2	0- 0	0- 6	1- 0
	2799-2920	1780-2600	2860-1560	3280-3190	3340-3320
180'	0- 0	0- 0	0- 0	0- 13	0- 13
	0- 0	0- 0	0- 0	0- 0	0- 2
	2745-2915	2709-2440	2400-973	3775-3250	3850-3400

	SUP	C13	C15	SUP	C8
0'	298-196	256-197	250-187	302-262	276-240
	109- 34	104- 36	113- 36	26-137	38-133
	- - -	- - -	- - -	- - -	- - -
20'	61- 78	157-148	272- 87	193-157	86-183
	36- 14	48- 10	32- 10	4- 72	156- 78
	2080-513	575-165	945-449	758-1814	27-1280
40'	123-113	183-131	26- 35	236-130	52- 65
	54- 28	6- 2	4- 0	16-108	24- 14
	2227-909	758-217	1172-616	1302-3200	71-1238
80'	57- 21	0- 0	0- 0	35- 62	8- 8
	10- 0	0- 0	0- 0	2- 4	8- 0
	2555-864	346-323	994-538	1864-4900	31-1028
180'	4- 0	0- 0	0- 0	4- 26	13- 0
	0- 0	0- 0	0- 0	6- 28	16- 0
	2832-1504	618-494	1138-647	1649-5848	50-1215

In dem zweiten Caprylsäureversuch wurden 15 mg. der Säure eingesetzt, nicht wie im ersten 10 mg.

	SUP	Mn	CO
	121-217	121-200	- -
0'	40- 50	32- 46	- -
	- -	- -	- -
	43- 52	43- 0	13- 0
20'	28- 10	18- 2	64- 36
	4440-1650	4950-2220	4570-1322
	30- 13	4- 0	4- 0
40'	6- 4	6- 0	4- 6
	3145-1888	3675-2786	3740-1774
	4- 4	0- 0	0- 0
80'	6- 4	4- 0	0- 10
	4180-1960	5250-2170	4850-1870
	0- 0	4- 0	0- 0
180'	6- 0	0- 0	2- 0
	5770-2090	4910-2230	4025-1520

C. DISKUSSION UND ZUSAMMENFASSUNG

Unsere Syntheseversuche zeigten die schon von v. BRAND beschriebenen Ergebnisse. Allein die energetischen Verhältnisse, von denen eine gewisse Parallelität zu den jeweiligen Synthesewerten erwartet werden durfte, entsprachen nicht in allem diesen Erwartungen. Der von LAMPRECHT verbesserte Test Warburgs ermöglicht insofern exakte ATP-Werte, als er im ersten Schritt die im Leberhomogenat physiologisch vorhandene Glukose-6-Phosphat erfasst. Das im SUP enthaltene freie ATP reagiert im zweiten Schritt mit der zugefügten Glukose und ist auf die anfangs beschriebene Weise erfassbar. Vorausgesetzt, das ATP wird ausschliesslich für die Phosphorylierung der Glukose verbraucht, müsste der ATP-Abfall während der Synthese proportional dem Synthese-Anstieg sein; das war aber keineswegs der Fall. Es war zu beobachten, dass bei Zusätzen, die eine eindeutige Synthesehemmung bewirkten (wie zum Beispiel Capryl-, Undecyl-, Tridecyl- und Pentadecylsäure) die ATP-Werte trotzdem im Vergleich zum Normal-SUP beschleunigt abfielen. Der Caprinsäurezusatz, der die Synthese wesentlich hemmt, zeigte keine Beeinflussung des ATP-Abfalls, das heisst, der ATP-Abfall von Normal-SUP und Zusatz-SUP unterschied sich nicht. Bei den Zusätzen von Propion-, Butter-, Valerian- und Capronsäure erschien die Synthese unbeeinflusst. Auch diese ATP-Werte zeigten keine Änderungen.

Es stellt sich also die Frage, in welche Reaktionen das ATP ausgewichen sein könnte oder zumindest welcher Vorgang sein Erfassen in dem von uns verwandten

Test unmöglich gemacht haben könnte.

Bei den Glukose-6-Phosphatwerten ergaben sich im wesentlichen dieselben Werte des Normal-SUP auch für die Zusatz-SUP. Die in Kurven dargestellten Werte zeigten einen allmählichen Abfall.

Der starken Synthesesteigerung durch $MnCl_2$ stand ein im Vergleich zum Normal-SUP beschleunigter ATP-Abfall gegenüber. In diesem Ergebnis lässt sich in etwa eine Proportionalität zwischen Synthesebeeinflussung durch den Zusatz und dem ATP-Abfall feststellen.

Auch die CO_2 -Begasung, deren synthesessteigernder Effekt quantitativ unter dem des $MnCl_2$ lag, zeigte eine erkennbare Abhängigkeit von Synthese und ATP-Gehalt.

Der "Faktor-Zusatz brachte neben der erwarteten Synthesesteigerung in der ATP-Kurve nach anfänglichem Abfall in 5 von 7 Fällen bei 40 min. Inkubationszeit ein Maximum. Bei 2 Fällen lag das Maximum bei 80 min. Über die Natur des "Faktors" ist noch nichts näheres bekannt. Es konnte lediglich ausgeschlossen werden, dass es sich dabei um einen Eiweisskörper handelt; dagegen spricht schon das Darstellverfahren. Ein Eiweisskörper übersteht in der Regel nicht ein 20 min. Kochen.

In welcher Form und auf welche Weise diese Energie, deren Wirkung auf die Fettsäuresynthese der des ATP gleicht, freigemacht wird, ist uns völlig unklar. Die Wirkung ist im Kurvenvergleich erkennbar. Die Kurve der Fettsäuresynthese unterscheidet sich erst dann in der Zeit von 20-80 min. Inkubationszeit von der des Normal-SUP, wenn sich auch in der ATP-Kurve der Verlauf des "Faktor-"SUP von der des Normal-SUP trennt, ersterer nämlich dem Maximum zustrebt.

Das Glukose-6-Phosphat zeigte in den "Faktor-"SUP Versuchen ebenfalls ein Maximum, das dem des ATP ähnelte. Während das ATP-Maximum in 71 % der Fälle bei 40 min. Inkubationszeit erreicht wurde, brachten die Glukose-6-Phosphatwerte nur bei 42 % (nämlich bei 3 von 7 Fällen) ähnliche Ergebnisse. Eine Gesetzmässigkeit konnten wir nicht feststellen.

ZUSAMMENFASSUNG

Es wurden die wichtigsten Abbauvorgänge im Stoffwechsel bis zur Entstehung der "aktivierten Essigsäure" und deren Bedeutung im intermediären Stoffwechsel geschildert, wobei auf die Parallelität bestimmter Ab- und Aufbauvorgänge hingewiesen wurde.

Als Energieträger, der diese Vorgänge ermöglicht, wurde das Adenosintriphosphat (ATP) und seine Biochemie beschrieben.

Für die Fettsäuresynthese wurde ein von BRADY und GURIN beschriebenes fettsäuresynthetisierendes Enzymssystem aus Taubenlebern verwandt.

Der ATP-Gehalt wurde mittels eines enzymatischen Testes vor und nach der Synthese bestimmt. Die Bestimmung der Höhe der Fettsäuresynthese wurde nach früher beschriebenen Methoden durchgeführt.

Es konnte bei dem Zusatz von Propion-, Butter-, Valerian-, Caprin- und Capronsäure ein reziproke Proportionalität zwischen der Höhe der Fettsäuresynthese und dem ATP-Gehalt festgestellt werden.

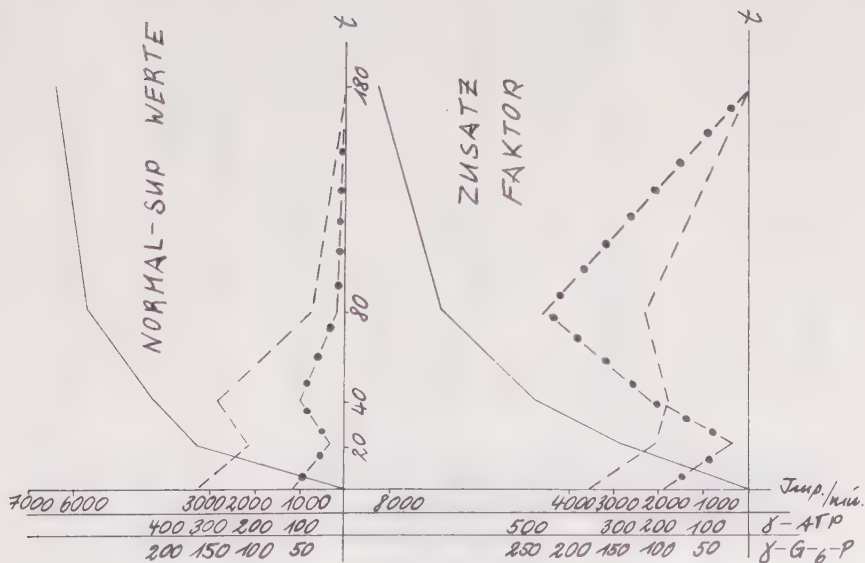
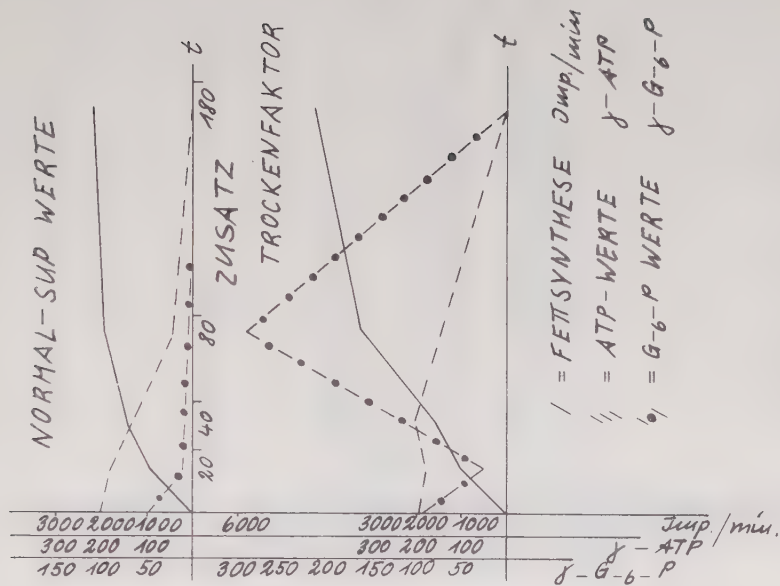
Bei dem Zusatz von Capryl-, Undecyl-, Tridecyl- und Pentadecylsäure fielen die ATP-Werte trotz gehemmter Synthese rascher ab.

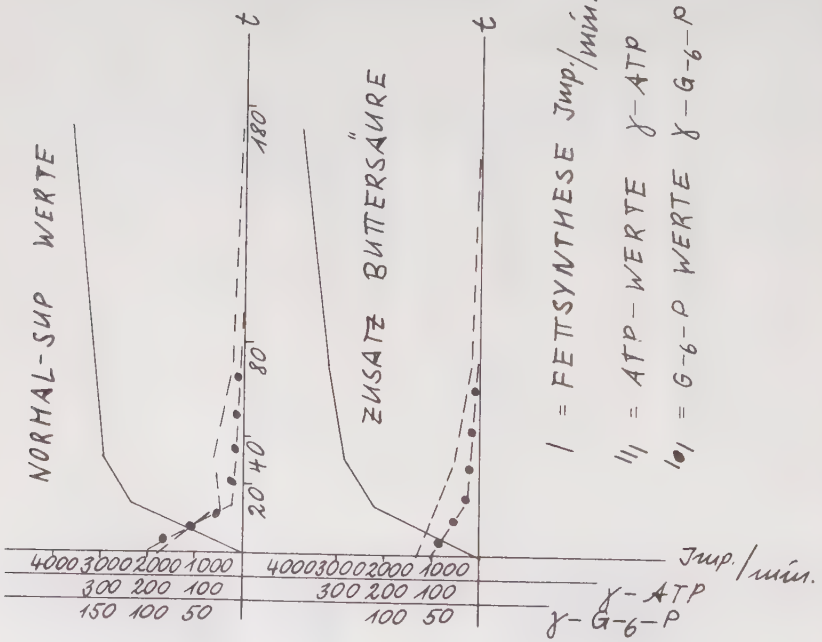
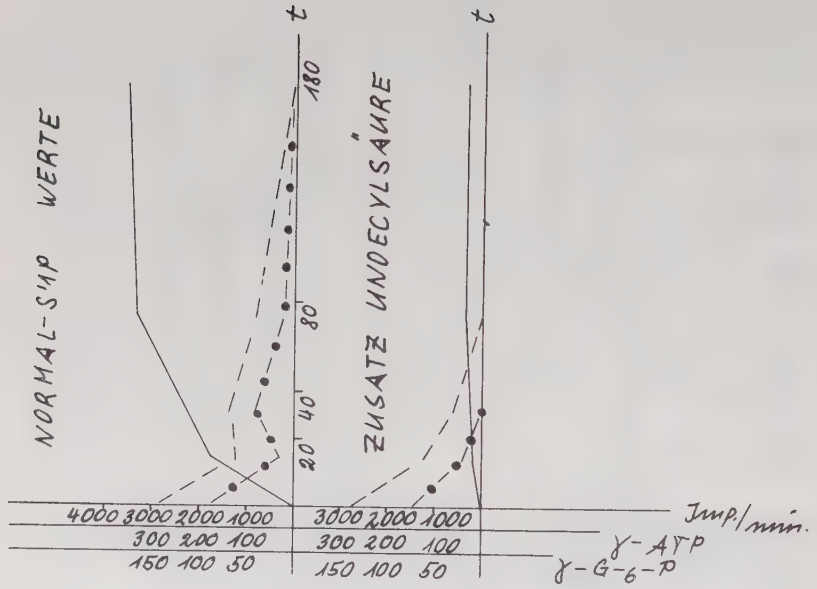
Auch der $MnCl_2$ -Zusatz sowie die CO_2 -Begasung führten zu einer Gesetzmässigkeit zwischen der Höhe der Fettsäuresynthese und der des ATP.

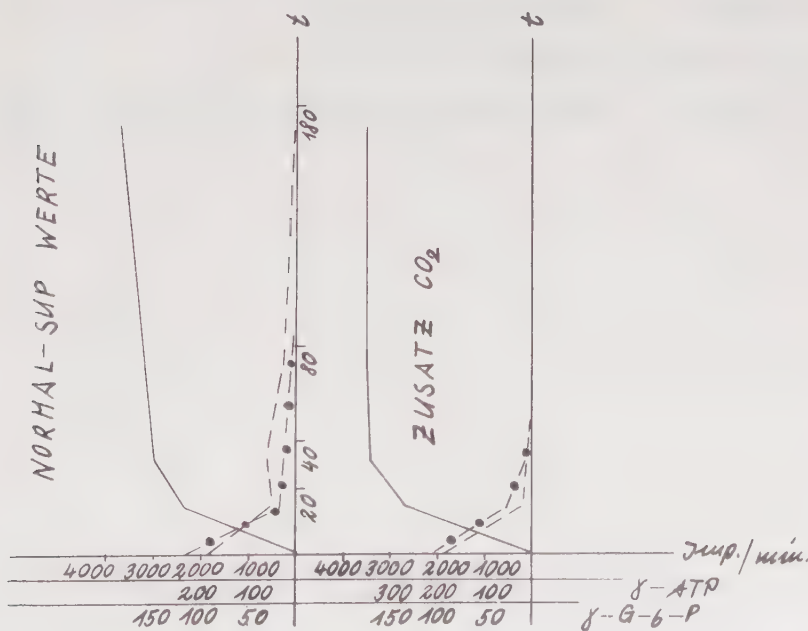
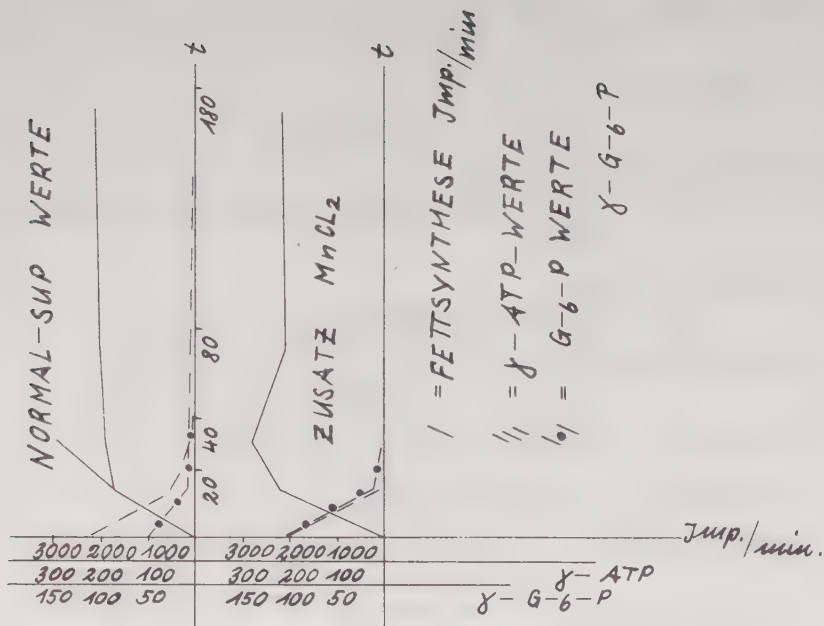
Bei den Versuchen, in denen wir "Faktor" als Zusatz verwendet haben, zeigte sich nach 20 min. Inkubationszeit ein allmählicher ATP-Anstieg, um bei 40 min. ein Maximum zu erreichen, das in einigen Fällen sogar über dem Ausgangswert lag.

Die Glukose-6-Phosphatverhältnisse wechselten ständig, wiesen aber stets ebenfalls ein Maximum nach anfänglichem Abfall auf.

Die Resultate werden diskutiert.







LITERATURNACHWEIS

- 1) LEUTHARDT: Lehrbuch für physiologische Chemie, Walther De Gruyther Verlag (1959)
- 2) LIPMANN, JONES, BLACK:
Am.Soc. 74 2384 (1952)
- 3) FLANKENTRÄGER, LEHNARTZ:
Physiologische Chemie, 2. Band, 1. Teil, Springer-Verlag Berlin
- 4) POPJAK, BEEKMANS:
Biochem.J. 47 233 (1951)
- 5) BLOCH, RITTENBERGER:
J. biol.Ch. 145 625 (1942)
- 6) KARLSON: Biochemie, Thieme-Verlag (1961)
- 7) LAMPRECHT: persönliche Mitteilung
- 8) v.BRAND, SEITZ:
Klin. Wochensch. Jan. 58 87/88
- 9) F.LYNEN, DECKER:
Ergebnisse der Physiol. 49 327 (1957)
- 10) v.BRAND: unveröffentlichte Ergebnisse
- 11) BRADY, GURIN: J. biol.Ch. 199 421 (1952)
- 12) H. NETTER: Biolog. Physikochemie Potsdamer Verlagsgesell. (1951)

Für die Überlassung des Themas und die Möglichkeit im Isotopenlabor arbeiten zu dürfen, danke ich Herrn Prof. Dr. W. SEITZ herzlich.

Mein besonderer Dank gilt Frau Dr. Dr. v. BRAND, die mich in die Materie dieser Arbeit einführte und unter deren Anleitung diese Arbeit entstand.

Meinen Kollegen, Herrn cand. med. Hartmann und Herrn cand. med. Woché sei bestens für ihre Hilfe gedankt.

Den beiden technischen Assistentinnen Frä. Wilde und Frä. Thöring möchte ich herzlich für ihre Mitarbeit danken.

LEBENS LAUF

Am 26. Januar 1936 wurde ich in Erfurt geboren. Ab 1942 besuchte ich in Chemnitz, nach 1945 in Erfurt die Volksschule. Hier trat ich auch in die Oberschule "Himmelspforte" ein und machte 1955 das Abitur. Im März des Jahres 1956 legte ich in Stuttgart am Katharinen-Gymnasium die für ehemalige Bewohner der Sowjetischen Besatzungszone geforderte Ergänzungsprüfung zum Ost-Abitur ab. Zum Sommersemester 1956 immatrikulierte ich mich an der Ludwig-Maximilian-Universität in München. Hier legte ich im Sommersemester 1958 das Physikum und am 7. 7. 1962 das Staatsexamen ab.

